



(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **09143167 A**
 (43) Date of publication of application: **03.06.1997**

(51) Int. Cl **C07D239/06**
 C12N 9/96

(21) Application number: **07323801**
 (22) Date of filing: **17.11.1995**

(71) Applicant: **DAINIPPON PHARMACEUT CO LTD**

(72) Inventor: **TOYODA YASUHIRO
 OOWAYA KAZUHIKO
 TAKANO MITSUO
 SHIBATA SEIICHI**

(54) STABILIZATION OF ENZYME**(57) Abstract:**

PROBLEM TO BE SOLVED: To prevent denaturation of an enzyme in storage of an enzymatic solution or in enzymatic reaction and retain and stabilize enzymatic activity by adding ectoine to the enzymatic solution.

SOLUTION: Ectoine of a factor having salt tolerance which is an intracellular product of *Halomonas* sp. KS-3 strain of a halophilic bacterium is added to an enzymatic solution. Furthermore, amylase, lipase, cellulase or protease is preferably utilized as the enzyme. The ectoine is added to an enzymatic solution in an amount of 0.05-50% (w/v), preferably 0.1-25% (w/v), especially preferably 0.5-15% (w/v).

COPYRIGHT: (C)1997,JPO

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-143167

(43)公開日 平成9年(1997)6月3日

(51)Int.Cl.^o
C 0 7 D 239/06
C 1 2 N 9/96

識別記号 庁内整理番号

F I
C 0 7 D 239/06
C 1 2 N 9/96

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数3 FD (全5頁)

(21)出願番号 特願平7-323801

(22)出願日 平成7年(1995)11月17日

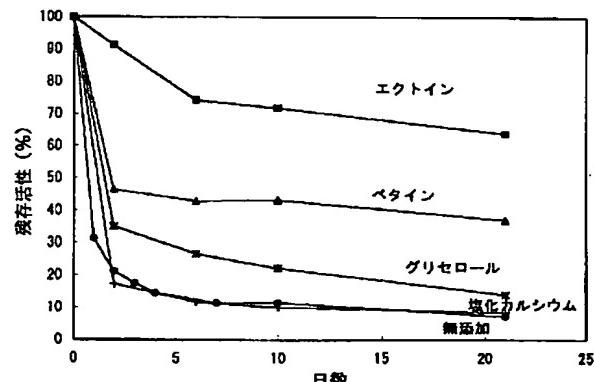
(71)出願人 000002912
大日本製薬株式会社
大阪府大阪市中央区道修町2丁目6番8号
(72)発明者 豊田 康裕
大阪府松原市天美南3丁目14番7号
(72)発明者 大和谷 和彦
大阪府貝塚市橋本35丁目1番 ドミールタ
チバナ和泉 橋本403号
(72)発明者 高野 光男
大阪府豊中市新千里東町3丁目7A-39-
207
(72)発明者 柴田 征一
大阪府富田林市新育葉丘町7番5号
(74)代理人 弁理士 坪井 有四郎

(54)【発明の名称】 酵素の安定化法

(57)【要約】

【課題】 酵素溶液の保存、または酵素反応における酵素の安定化法。

【解決手段】 酵素溶液を保存するとき、または酵素反応するときに、適当量のエクトインを添加しておくと、酵素溶液を長期間安定に保存でき、また、酵素反応において酵素活性の低下を防ぎ、反応を安定に行わせることが可能である。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 エクトインを添加することを特徴とする酵素の安定化法。

【請求項2】 酵素溶液の保存において、または酵素反応においてエクトインを添加する請求項1記載の酵素の安定化法。

【請求項3】 酵素がアミラーゼ、リバーゼ、セルラーゼ、またはプロテアーゼである請求項1又は2記載の酵素の安定化法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、エクトインを添加することを特徴とする酵素の安定化法、特に、酵素溶液の保存または酵素反応において、酵素の変性を防ぎ、酵素活性を保持する方法に関する。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】酵素は、現在、食品、洗剤、診断用、繊維加工など様々な分野で利用されている。酵素は主として蛋白質からできており、熱やpHなどにより変性し、活性が低下するか、もしくは失われる。特に、水溶液状態では不安定で、変性し易く、そのため、溶液状態での酵素の安定化法が種々研究されている。例えば、酵素溶液中に種々のアミノ酸（グリシンペタインなど）、糖（蔗糖、マルトース、トレハロースなど）、ポリオール（グリセロールなど）、金属イオン（カルシウムイオンなど）を添加して酵素を安定化させる方法が知られている。また、その安定化機構についても研究されている〔例えば、月向邦彦、蛋白質 核酸 酵素 Vol. 30(10), pp 1115-1126 (1985)〕。しかしながら、その安定化の効果は十分であるとはいえない。また、これらの安定化剤は酵素の種類によって異なり、安定化剤の選択が必要であった。

【0003】一般に酵素は粉末状よりも液状（溶液）の方が取り扱いが簡便であるため、現在では市販酵素は液状品が増加している。しかしながら、酵素の液状品は一般に安定性が低い。例えば、リバーゼを溶液状態で保存すると、上述の安定化剤を添加しても活性の低下が著しいので、リバーゼの溶液保存は極めて困難である。したがって、溶液状態で不安定な酵素を安定化させ得る安定化剤が望まれている。また、酵素反応において、酵素の反応性を高めるため通常比較的高温下で反応させるが、その際にも酵素蛋白の熱変性という問題があった。例えば、通常55°C以下で酵素反応を行うと、菌による腐敗が起こりやすいので、55°C以上で反応を行うことが望ましいが、そのような高温下では熱安定性の低い酵素は失活する。そのため、酵素反応時の活性低下を防ぎ、反応を安定に行わせる酵素の安定化剤が望まれている。

【0004】上述のように、酵素の溶液保存または酵素反応において、いずれの酵素にも適用可能で、効果的な

酵素の溶液安定化剤はこれまで知られていなかった。

【0005】一方、エクトインは、1, 4, 5, 6-テトラヒドロ-2-メチル-4-ピリミジンカルボン酸、又は3, 4, 5, 6-テトラヒドロ-2-メチル-4-ピリミジンカルボン酸の化学名を有する環状アミノ酸であり、好塩性細菌 *Ectothiorhodospira halochloris* が生産する補償溶質として発見され、その高浸透圧に対する耐性作用（すなわち、高浸透圧耐性）が知られている（Galinski, E. A. ら, Eur. J. Biochem., Vol. 149, pp135-139 (1985); 高野光男ら, 日本発酵工学会大会プログラム第193 頁 1988 年）。また、エクトインを微生物から抽出単離する方法（Khunajakr, N. ら, Annual Reports of International Center of Cooperative Research in Biotechnology, Japan, Vol. 12, pp157-167 (1989)）や化学的に合成する方法（特開平3-31265号）が知られている。

【0006】さらに、乳酸デヒドロゲナーゼおよびホスホフルクトキナーゼについてエクトインの添加による耐凍結・解凍性、耐凍結乾燥および耐熱性の付与が知られている〔Lippert, K. ら, Appl Microbiol Biotechnol (1992) 37: 61-65〕。しかしながら、酵素の溶液保存での安定性や酵素反応での安定性については知られていない。

【0007】本発明者らはエクトインの有用性を調べていて、エクトインが酵素溶液を安定化させることを見出した。

【0008】本発明の目的はエクトインを用いて、1)酵素を溶液状態で長期間安定に保存する方法、2)酵素反応時の活性低下を防ぎ反応を安定に行わせる方法、3)熱安定性の低い酵素の熱安定性を高め、高温下で迅速に反応させるとともに、菌による腐敗が起こりにくい55°C以上で反応させる方法および4)取扱が簡便かつ普遍的である方法を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、酵素溶液を安定化させる方法について鋭意研究した結果、タイ国北東部の土壤に生息する好塩性細菌ハロモナス属KS-3株 (*Halomonas* sp. KS-3) の菌体内産物である耐塩性因子エクトインを酵素溶液に添加すると有効かつ普遍的に酵素を安定化させることができることを見出した。

【0010】本発明によれば、酵素溶液中に適宜選択された量のエクトインを添加すると、保存時または酵素反応時においても、長時間酵素を効果的に安定化させることができるのである。溶液状態で不安定な酵素、例えばリバーゼやアミラーゼも長時間保存が可能である。また、高温下での酵素の利用、例えば55°C以上のセルラーゼやプロテアーゼの利用が可能である。

【0011】酵素を溶液状態で保存するとき、酵素濃度は特に限定はしないが、例えば10μg/mlから100mg/mlである。酵素溶液へのエクトインの添加量は、特に限定し

ないが、0.05～50% (w/v) 、好ましくは0.1～25% (w/v) 、特に好ましくは0.5～15% (w/v) である。添加量が0.05% (w/v) 以下では効果がなく、50% (w/v) 以上ではエクトインが完全には溶解しない。通常、エクトインの濃度は酵素の100～10万倍モルで使用される。また、酵素を反応させるときの酵素濃度およびエクトインの添加量は上記の酵素の溶液保存時と同様である。その添加時期は反応の初期または中途の段階のいずれでもよい。

【0012】本発明に用いるエクトインは、化学合成によっても、微生物から抽出単離しても入手しうるが、食品分野で用いられる場合も考慮して、より安全性の高い後者から得るのが好ましく、特に、微生物として好塩性菌*Halomonas* sp. からの入手が好ましい。エクトインは単離・精製すると粉末として得られるので、この粉末を直接にまたは水に溶かした状態で使用することができる。

【0013】本発明に用いられる酵素の種類は特に限定しないが、ペルオキシダーゼなどの酸化還元酵素、グルカノトランスフェラーゼなどの転移酵素、ペクチンアーゼなどの脱離酵素、グルコースイソメラーゼなどの異性化酵素、グルタミンシンテースなどの合成酵素、リパーゼなどの加水分解酵素などが挙げられ、動物、植物、微生物由来のいずれでもよい。特に、本発明に用いられる酵素としては現在、食品、洗剤、診断用、繊維加工などの分野で利用されている加水分解酵素、例えばアミラーゼ、リバーゼ、セルラーゼ、プロテアーゼが好ましい。

【0014】本発明における酵素の安定化剤として、エクトインを単独使用しうるものであるが、公知のアミノ酸、糖、ポリオール、金属イオンなどと併用してもよい。

【0015】

【発明の効果】本発明の実施の効果としては、1)酵素溶液を長期間安定に保存でき、2)酵素反応における酵素活性の低下を防ぎ、反応を安定に行わせることができる、また、3)熱安定性の低い酵素の熱安定性を向上させ、菌による腐敗の起こりにくい55℃以上の反応を可能とし、4)簡便かつ普遍的に行うことができることが挙げられる。

【0016】

【実施例】以下に参考例と実施例を挙げ本発明を詳細に説明するが、本発明は以下の実施例のみに限定されるものではない。

【0017】(参考例) エクトインの調製：-

好塩性細菌ハロモナス属KS-3株〔工業技術院生命工学技術研究所；国際寄託番号FERM BP-4841（平成6年10月20日移管）〕を、M63培地（組成：0.1M KH₂PO₄, 75mM KOH, 15mM (NH₄)₂SO₄, 1mM MgSO₄, 3.9 μM FeSO₄, 22mM glucose, 0.51M NaCl）に0.25% (w/v) 酵母エキスを加え（濃度はすべて終濃度）、通気攪拌条件下37℃で一夜前

培養した。この前培養液を110mM のグルコースを含んだM63培地に2 %濃度で接種し、30℃で通気条件(0.5vvm)下に攪拌し、培養した。約7 時間培養し、培養菌液の濁度（波長660nm の吸光度）が約1.5 に達した時に、塩化ナトリウムを最終濃度2.56M となるように添加し、更に10時間培養した。遠心分離にて菌体を採取し洗浄、菌体(wet)を得た。この菌体を10倍量の70%エタノールで80℃にて10分間攪拌し、ガラスフィルターによる沪過にて粗抽出液を得た。その粗抽出液中のエタノールを減圧濃縮(35 °C) にて除去した濃縮液に、同量のクロロホルムを添加混合した後、遠心分離(8,000 rpm, 30分間) した。次いで、その遠心上層液（水層）を回収し、減圧下に濃縮乾固した。残留物にクロロホルム処理時と同量のエタノールを加え、不溶物を遠心分離(8,000 rpm, 30分間) で除去した。遠心上清液を減圧下に濃縮乾固した後、残留物を適量の蒸留水に溶解させ、陰イオン交換カラム(DIAION SA10A, 三菱化成株式会社製) に負荷する。洗浄画分にエクトインが溶出し、これを回収後凍結乾燥し、粉末精製のエクトインを得た。エクトインの分析は、ピータースらの方法(Peters, P. ら, FEMS Microbiol. Lett., Vol. 71, pp157-162 (1990)) にしたがって、高速液体クロマトグラフィーまたは薄層クロマトグラフィーを用いて行った。上記の培養・精製を1000L タンクで行ったとき、湿重量6.2kg の菌体から約40g の粉末精製のエクトインを得た。

【0018】(実施例1) α-アミラーゼの溶液安定性：-

細菌α-アミラーゼ〔大和化成（株）製〕を50 μg/10ml となるようにイオン交換水に溶解した。この酵素溶液にエクトインを10% (w/v) になるように添加した後37℃で静置し、経日的に残存酵素活性を測定した。α-アミラーゼの酵素活性の測定は、基質として可溶性デンプン（メルク社製）を用い、生成した還元糖量をSomogyi-Nelson法〔N. Nelson, J. Biol. Chem., 153, 375 (1944); M. Somogyi, J. Biol. Chem., 195, 19 (1952)〕で測定することにより行った。この場合の酵素活性1ユニークットは1分間に1 μmoleのグルコース当量の還元糖を遊離する酵素量と定義した。また、エクトイン添加直後の酵素活性を100 %とした。結果を図1に示す。

【0019】図1から明らかなように、エクトインを添加するとα-アミラーゼの溶液安定性は顕著に向上了した。

【0020】(実施例2) リバーゼAKの溶液安定性

(1) :-

リバーゼAK〔天野製薬（株）製〕を 100 μg/10ml となるようイオン交換水に溶解した。この酵素溶液にエクトインをそれぞれ0.1 % (w/v), 1.0 % (w/v) および10% (w/v) になるように添加した後、37℃で静置し、経日的に残存酵素活性をそれぞれ測定した。リバーゼAKの活性測定は、リバーゼキットS〔大日本製薬（株）製〕を用

いて行った。すなわち、基質として三酪酸ジメルカプロールを用い、リバーゼの作用により生成したメルカプロールに2-ニトロ安息香酸を添加し、生成したTNBアニオンを波長420nmでの吸光度を測定することにより行った。この場合の酵素活性1ユーニットは基質を加えていないコントロールと比較して1分間に吸光度差が0.001生じた場合の酵素量と定義した。また、各溶液添加直後の酵素活性を100%とした。結果を図2に示す。

【0021】図2から明らかなように、エクトインの添加量を増やすにつれて、リバーゼAKの安定性は向上した。

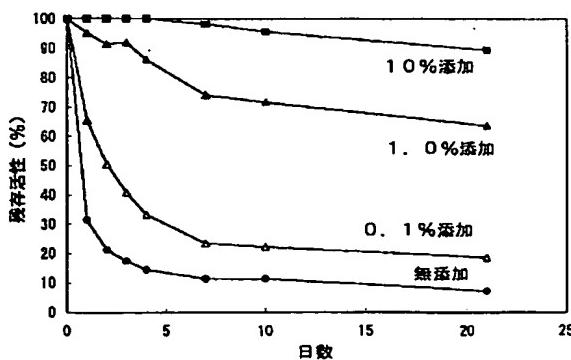
【0022】(実施例3) リバーゼAKの溶液安定性(2) :

リバーゼAK〔天野製薬(株)製〕を100μg/10mlとなるようにイオン交換水に溶解する。この酵素溶液にエクトインを1.0%(w/v)(0.07M)になるように添加する。37°Cで静置し、経日的に残存酵素活性を測定した。測定法は実施例2と同じ。比較対照として、グリシンベタイン、グリセロールおよび塩化カルシウムをエクトインと同モル濃度になるように調製して用いた。結果を図3に示す。

【0023】図3から明らかなように、他剤に比べ、エクトインを添加するとリバーゼAKの安定性は顕著に向上了。

【0024】(実施例4) 70°Cおよび80°Cでの酵素反応におけるセルラーゼの熱安定性: セルラーゼ“オノズカ”3S〔ヤクルト本社(株)製〕を500μg/10mlとなるようにイオン交換水に溶解する。この酵素溶液にエクトインを1.0%(w/v)になるように添加する。次いで、この酵素溶液に基質のカルボキシメルセルロースナトリウム(CMC-Na)〔和光純薬工業(株)製〕を1.0%(w/v)添加し、70°Cおよび80°Cでそれぞれ酵素反応させた。生成する還元糖量を実施例1と同様にSomogyi-Nelson法で経時に測定した。結果を図4(70°Cでの酵素反応)および図5(80°Cでの酵素反応)にそれぞれ示す。

【図2】



【0025】図4と図5から明らかなように、エクトインを添加すると高温下の酵素反応におけるセルラーゼの熱安定性は有意に向上した。

【0026】

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は α -アミラーゼの溶液安定性を示す。縦軸は α -アミラーゼの残存活性(%)を表し、横軸は日数を表す。記号—■—はエクトインの10%(w/v)添加時の曲線を、記号—●—はエクトイン無添加時の曲線を示す。

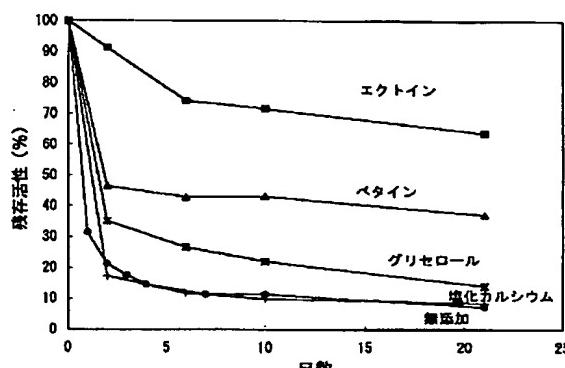
【図2】図2はリバーゼAKの溶液安定性を示す。縦軸はリバーゼAKの残存活性(%)を表し、横軸は日数を表す。記号—■—、記号—▲—および記号—△—はエクトインをそれぞれ10%(w/v)、1.0%(w/v)および0.1%(w/v)添加したときの曲線を、記号—●—はエクトイン無添加時の曲線を示す。

【図3】図3はリバーゼAKの溶液にエクトインを1.0%(w/v)添加したときのリバーゼAKの溶液安定性を示す。比較対照として、グリシンベタイン、グリセロールおよび塩化カルシウムをそれぞれ1.0%(w/v)用いた。縦軸はリバーゼAKの残存活性(%)を表し、横軸は日数を表す。記号—■—はエクトインを添加したときの曲線を、記号—▲—、記号—*—および記号—+—はそれぞれ比較対照のグリシンベタイン(ベタインで表示)、グリセロールおよび塩化カルシウムを添加したときの曲線を、記号—●—は無添加時の曲線を示す。

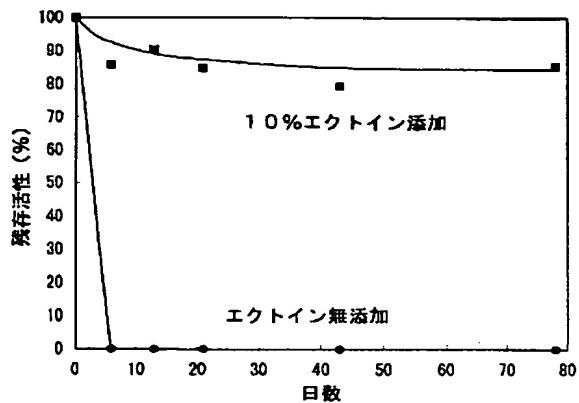
【図4】図4は70°Cでの酵素反応におけるセルラーゼの熱安定性を示す。縦軸は生成還元糖量(グルコース換算量: μg/ml)を表し、横軸は反応時間(分)を表す。記号—■—はエクトインの1.0%(w/v)添加時の曲線を、記号—●—はエクトイン無添加時の曲線を示す。

【図5】図5は80°Cでの酵素反応におけるセルラーゼの熱安定性を示す。縦軸は生成還元糖量(グルコース換算量: μg/ml)を表し、横軸は反応時間(分)を表す。記号—■—はエクトインの1.0%(w/v)添加時の曲線、記号—●—はエクトイン無添加時の曲線を示す。

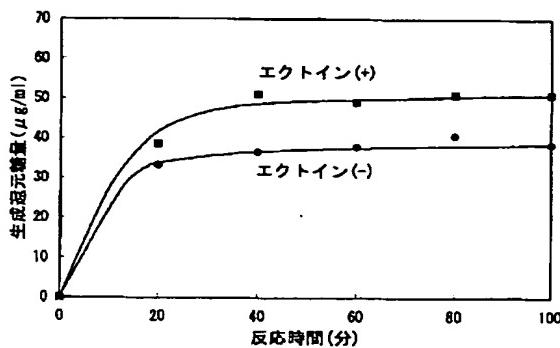
【図3】



【図1】



【図4】



【図5】

